

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
3. Januar 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/01189 A1(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 15/14

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/07190

(22) Internationales Anmeldedatum:
25. Juni 2001 (25.06.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 31 028.1 26. Juni 2000 (26.06.2000) DE(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): GNOTHIS HOLDING S.A. [CH/CH]; CH-1015
Ecublens (CH).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RIGLER, Rudolf
[AT/CH]; 115, rue du Centre, CH-1025 St-Sulpice (CH).(74) Anwalt: WEICKMANN & WEICKMANN; Postfach
860 820, 81635 München (DE).(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

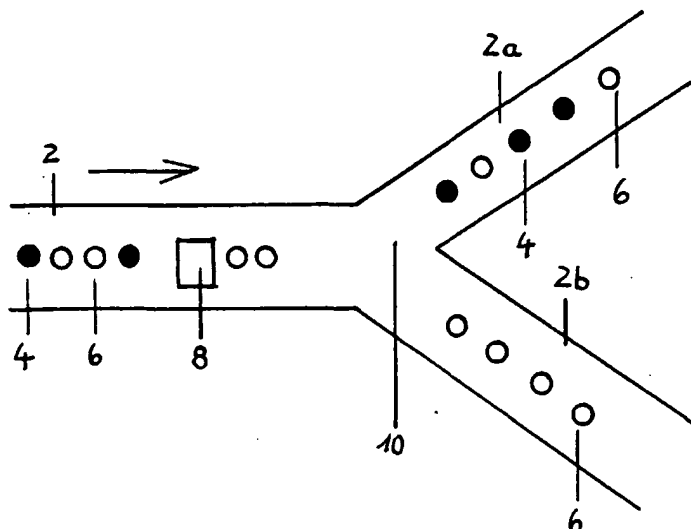
Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR SELECTING PARTICLES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR SELEKTION VON PARTIKELN

(57) Abstract: The invention relates
to a method for selecting particles with
a predetermined characteristic from a
population comprising a large number
of different particles. The invention also
relates to a device that is suitable for
carrying out said method.(57) Zusammenfassung: Die Erfindung
betrifft ein Verfahren zur Selektion
von Partikeln mit einer vorbestimmten
Eigenschaft aus einer Population einer
Vielzahl unterschiedlicher Partikel sowie
eine zur Durchführung des Verfahrens
geeignete Vorrichtung.

WO 02/01189 A1

Verfahren zur Selektion von Partikeln

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Selektion von Partikeln mit einer vorbestimmten Eigenschaft aus einer Population einer Vielzahl unterschiedlicher Partikel sowie eine zur Durchführung des Verfahrens geeignete Vorrichtung.

10

Zur Identifizierung neuer Liganden für diagnostische, biomedizinische und pharmazeutische Anwendungen können kombinatorische Bibliotheken, bestehend aus einer Population einer Vielzahl von Partikeln, z.B. Phagen, Zellen, Ribosomen etc., eingesetzt werden, wobei die einzelnen Partikel jeweils unterschiedliche Liganden präsentieren (siehe z.B. WO90/02809; WO92/15677; WO92/15679; WO92/06204; WO92/06176; WO98/19162; WO98/35232; WO99/06839 und WO99/5428). Zur Identifizierung von Liganden mit einer vorbestimmten Eigenschaft wird üblicherweise eine Musterung der zu untersuchenden Bibliothek durchgeführt, wobei ein markiertes Zielmolekül mit den einzelnen Partikeln der Bibliothek in Kontakt gebracht wird und das Auftreten einer Bindung zwischen dem Zielmolekül und einem bestimmten Partikel der Bibliothek bzw. dem von dem Partikel präsentierten Liganden bestimmt wird. Anschließend muss das Partikel mit der vorbestimmten Eigenschaft identifiziert werden. Bisherige Selektions- und Identifizierungsmethoden, z.B. die sogenannten "Penning"- oder "Selex"-Verfahren haben jedoch eine relativ geringe Effizienz, sodass ein bestimmtes Partikel mit gewünschten Eigenschaften oftmals nicht in der Bibliothek gefunden werden kann, obwohl es dort vorhanden ist.

25

30

Ein direkter Nachweis von einzelnen Analytmolekülen ist mit dem im europäischen Patent O 679 251 beschriebenen Verfahren zur Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) beschrieben. Mittels FCS kann in einem

- 2 -

kleinen Messvolumen von beispielsweise $< 10^{-14}$ l ein einziges oder nur wenige mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Moleküle nachgewiesen werden. Das Messprinzip der FCS beruht darauf, dass ein kleines Volumenelement der Probeflüssigkeit einem starken Anregungslicht, z.B. eines Lasers ausgesetzt wird, sodass nur diejenigen Fluoreszenzmoleküle, die sich in diesem Messvolumen aufhalten, angeregt werden. Das emittierte Fluoreszenzlicht aus diesem Volumenelement wird dann auf einen Detektor, z.B. einen Fotomultiplier abgebildet. Ein Molekül, das sich im Volumenelement befindet, wird sich gemäß seiner charakteristischen Diffusionsgeschwindigkeit mit einer durchschnittlichen, aber für das betreffende Molekül charakteristischen Zeit wieder aus dem Volumenelement entfernen und dann nicht mehr zu beobachten sein.

Wird nun die Lumineszenz ein- und desselben Moleküls während seiner durchschnittlichen Aufenthaltsdauer in dem Messvolumen mehrmals angeregt, so lassen sich von diesem Molekül viele Signale erfassen.

Die Anwendung der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie zur Sortierung und Identifizierung einzelner Moleküle ist bei Eigen und Rigler (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994), 5740-5747) und Rigler (J. Biotech. 41 (1995), 177-186) beschrieben. Es wird die Verwendung einer Quadrupol-Falle und elektrischer Feldgradienten in Verbindung mit Einzelphotonendetektoren zur Identifizierung von Einzelmolekülen vorgeschlagen. Obwohl dieses Verfahren gegenüber den klassischen Selektionierungsprozeduren eine erheblich höhere Effizienz aufweist, erfordert die Selektion von Einzelmolekülen die Verwendung extrem geringer Partikelkonzentrationen und ist zeitaufwendig. Es besteht daher ein Bedürfnis, die Sensitivität und Effizienz bei der Selektionierung von Partikeln zu verbessern.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Selektion eines Partikels mit einer vorbestimmten Eigenschaft aus einer Population einer Vielzahl unterschiedlicher Partikeln, umfassend die Schritte:

- 3 -

- (a) Bereitstellen einer Population von unterschiedlichen Partikeln,
- (b) Markieren von Partikeln, die die vorbestimmte Eigenschaft aufweisen,
- (c) Leiten der Partikel in einem Mikrokanal durch ein Detektionselement,
das zwischen markierten und nicht markierten Partikeln unterscheiden
kann,
- (d) Abtrennen markierter Partikel, und
- (e) mindestens einmaliges Wiederholen der Schritte (c) und (d), wobei
die Konzentration der Partikel in einem nachfolgenden Zyklus
gegenüber einem vorhergehenden Zyklus verringert wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Selektion von einzelnen Partikeln aus sehr großen Partikelpopulationen, die beispielsweise mehr als 10^8 oder sogar 10^{12} oder mehr unterschiedliche Partikel umfassen. Die Partikel können Zellen, Teile von Zelloberflächen, Zellorganellen, z.B. Ribosomen, Viren wie etwa Bakteriophagen, z.B. filamentöse Phagen oder in Phagenhüllen verpackte Plasmide (Phagemide), Nukleinsäuren wie Gene oder cDNA-Moleküle, Proteine wie etwa Enzyme oder Rezeptoren, oder niedermolekulare Substanzen sein. Vorzugsweise sind die Partikel Elemente einer kombinatorischen Bibliothek, z.B. einer Bibliothek von genetischen Packungen wie Phagen, Zellen, Sporen oder Ribosomen, die auf ihrer Oberfläche Peptidstrukturen, z.B. lineare oder zirkuläre Peptide, oder Proteine wie Antikörper, vorzugsweise fusioniert mit Oberflächenproteinen, z.B. Oberflächenproteinen von filamentösen Phagen, präsentieren.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht eine effiziente Selektion eines Partikels mit einer vorbestimmten Eigenschaft aus einer Vielzahl unterschiedlicher Partikel. Unter "vorbestimmte Eigenschaft" im Sinne der vorliegenden Erfindung ist vorzugsweise die Fähigkeit zur Bindung an eine Zielsubstanz zu verstehen. Die Bindung des Partikels an die Zielsubstanz kann eine Liganden-Rezeptor-Bindung, eine Enzym-Substrat-Bindung, eine Antikörper-Antigen-Bindung, eine Nukleinsäurehybridisierung, eine Zucker-Lectin-Bindung oder eine andere hochaffine biologische Wechselwirkung

- 4 -

umfassen. Andererseits kann die vorbestimmte Eigenschaft des Partikels auch darin bestehen, eine biologische Wechselwirkung, z.B. die Bindung an eine Zielsubstanz, zu verhindern.

5 Zur Selektion des Partikels mit der vorbestimmten Eigenschaft wird die Partikelpopulation vorzugsweise mit einer nachweisbaren Markierung tragenden Zielsubstanz inkubiert, wobei die Inkubationsbedingungen derart gewählt werden, dass das Partikel mit der vorbestimmten Eigenschaft an eine Markierungsgruppe bindet und so von anderen Partikeln abgetrennt werden kann. Als Markierungsgruppen kommen insbesondere nicht
10 radioaktive Markierungsgruppen und besonders bevorzugt durch optische Methoden nachweisbare Markierungsgruppen, wie etwa Farbstoffe, und insbesondere Fluoreszenzmarkierungsgruppen in Betracht. Beispiele für geeignete Fluoreszenzmarkierungsgruppen sind Rhodamin, Texas-Rot, Phycoerythrin, Fluorescein und andere in diagnostischen Verfahren oder
15 Selektionsverfahren übliche Fluoreszenzfarbstoffe.

Die markierte Zielsubstanz ist für das zu identifizierende Partikel spezifisch, d.h. die Zielsubstanz bindet unter den Testbedingungen mit ausreichend
20 hoher Affinität und Selektivität an das Partikel mit der vorbestimmten Eigenschaft, um eine Selektion zu ermöglichen.

Gegebenenfalls kann die vorbestimmte Eigenschaft des zu selektionierenden Partikels auch eine biologische Aktivität, z.B. eine enzymatische Aktivität
25 sein. In diesem Fall können die Partikel mit einem chromogenen oder fluoreszenten Enzymsubstrat inkubiert und in Vesikeln, z.B. Lipidvesikeln wie Liposomen, verkapselt werden. Sofern ein Partikel, z.B. ein Phage oder ein Ribosom, an seiner Oberfläche ein aktives Enzymmolekül präsentiert, erfolgt innerhalb des Vesikels eine Umsetzung des Substrats, wobei ein
30 farbiges oder fluoreszentes Produkt gebildet wird, welches nachgewiesen werden kann.

- 5 -

Zur Unterscheidung von markierten Partikeln, d.h. Partikeln mit der vorbestimmten Eigenschaft, und nicht markierten Partikeln, d.h. Partikeln ohne die vorbestimmte Eigenschaft, werden die Partikel in einem Mikrokanal durch ein Detektionselement geleitet. Das Leiten durch den Mikrokanal erfolgt vorzugsweise durch einen hydrodynamischen Fluss, beispielsweise durch Saug- oder Pumpwirkung. Der Fluss kann jedoch auch ein elektroosmotischer Fluss sein, der durch einen elektrischen Feldgradienten erzeugt wird. Weiterhin ist eine Kombination von hydrodynamischem Fluss und Feldgradienten möglich. Der Fluss durch den Mikrokanal weist vorzugsweise ein parabolisches Flussprofil auf, d.h. die Fließgeschwindigkeit ist maximal im Zentrum des Mikrokanals und nimmt in einer parabolischen Funktion zu den Rändern bis zu einer Minimalgeschwindigkeit ab. Die Flussgeschwindigkeit durch den Mikrokanal liegt im Maximum vorzugsweise im Bereich von 1 bis 50 mm/sec, besonders bevorzugt im Bereich von 5 bis 10 mm/sec. Der Durchmesser des Mikrokanals liegt vorzugsweise im Bereich von 1 bis 100 μm , besonders bevorzugt von 10 bis 50 μm . Vorzugsweise wird die Messung in einem linearen Mikrokanal mit im Wesentlichen einem konstanten Durchmesser durchgeführt.

Die Identifizierung eines markierten Partikels kann mittels einer beliebigen Messmethode, z.B. mit einer orts- und/oder zeitaufgelösten Fluoreszenz-Spektroskopie erfolgen, die in der Lage ist, in einem sehr kleinen Volumenelement wie es in einem Mikrokanal vorliegt, sehr geringe Signale von Markierungsgruppen, insbesondere Fluoreszenzsignale bis hinunter zur Einzelphotonenzählung zu erfassen. Wichtig ist dabei, dass die von markierten Partikeln stammenden Signale sich deutlich von denen unterscheiden, die von den markierten Partikeln verursacht werden.

Beispielsweise kann die Detektion mittels Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie erfolgen, bei der ein sehr kleines konfokales Volumenelement, beispielsweise $0,1 \text{ bis } 20 \times 10^{-15} \text{ l}$ der durch den Mikrokanal strömenden Probenflüssigkeit einem Anregungslicht eines Lasers

- 6 -

ausgesetzt wird, das die in diesem Messvolumen befindlichen Rezeptoren zur Emission von Fluoreszenzlicht anregt, wobei das emittierte Fluoreszenzlicht aus dem Messvolumen mittels eines Fotodetektors gemessen wird, und eine Korrelation zwischen der zeitlichen Veränderung
5 der gemessenen Emission und der relativen Flussgeschwindigkeit der beteiligten Moleküle erstellt wird, sodass bei entsprechend starker Verdünnung einzelne Moleküle in dem Messvolumen identifiziert werden können. Auf Einzelheiten zur Verfahrensdurchführung und apparative Details zu den für die Detektion verwendeten Vorrichtungen wird auf die
10 Offenbarung des europäischen Patentes 0 679 251 verwiesen.

Alternativ kann die Detektion auch durch eine zeitaufgelöste Abklingmessung, ein sogenanntes Time Gating erfolgen, wie beispielsweise von Rigler et al., "Picosecond Single Photon Fluorescence Spectroscopy of
15 Nucleic Acids", in: "Ultrafast Phenomenes", D.H. Auston, Ed., Springer 1984, beschrieben. Dabei erfolgt die Anregung der Fluoreszenzmoleküle innerhalb eines Messvolumens und anschließend - vorzugsweise in einem zeitlichen Abstand von ≥ 100 ps - das Öffnen eines Detektionsintervalls am Fotodetektor. Auf diese Weise können durch Raman-Effekte erzeugte
20 Hintergrundsignale ausreichend gering gehalten werden, um eine im Wesentlichen störungsfreie Detektion zu ermöglichen.

Besonders bevorzugt umfasst die Vorrichtung zum Nachweis von fluoreszenzmarkierten Partikeln in der den Mikrokanal durchströmenden
25 Probeflüssigkeit einen Laser als Fluoreszenzanregungslichtquelle für die Moleküle, eine optische Anordnung zur Leitung und Fokussierung von Laserlicht des Lasers auf einen Fokalbereich des Mikrokanals und zur konfokalen Abbildung des Fokalbereichs auf eine Fotodetektoranordnung zur Erfassung von Fluoreszenzlicht, welches im Fokalbereich von einem oder
30 gegebenenfalls mehreren optisch angeregten Molekülen emittiert wurde, wobei die optische Anordnung ein Beugungselement oder ein phasenmodulierendes Element im Strahlengang des Lasers aufweist,

- 7 -

welches gegebenenfalls in Kombination mit einem oder mehreren optischen Abbildungselementen dazu eingerichtet ist, aus dem Laserstrahl des Lasers ein Beugungsmuster in Form eines linearen oder zweidimensionalen Arrays von Fokalbereichen in dem Mikrokanal zu erzeugen, wobei die optische
5 Anordnung dazu eingerichtet ist, jeden Fokalbereich konfokal für die Fluoreszenzdetektion durch die Fotodetektoranordnung abzubilden. Alternativ kann die Detektionsvorrichtung zwei den Mikrokanal an einander gegenüberliegenden Seiten begrenzende Wände aufweisen, von denen eine ein Array von vorzugsweise integrierten, in den Mikrokanal emittierenden
10 Laserelementen als Fluoreszenzanregungslichtquellen aufweist, und von denen die andere ein Array von vorzugsweise integrierten, den Laserelementen jeweils gegenüberliegend zugeordneten Fotodetektorelementen als Fluoreszenzlichtdetektoren aufweist, wobei die Laserelemente vorzugsweise Potenzialtopflaser-elemente und die
15 Fotodetektorelemente Avalanche-Dioden sind. Derartige Vorrichtungen sind beispielsweise in DE 100 23 423.2 beschrieben.

Die durch das Detektionselement identifizierten markierten Partikel werden von nicht markierten Partikeln abgetrennt. Dieses Abtrennen kann durch
20 eine Sortierungsprozedur, wie in Holm et al. (Analytical Methods and Instrumentation, Special Issue μ TAS 96, 85-87), Eigen und Rigler (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994), 5740-5747) oder Rigler (J. Biotech 41 (1995), 177-186) beschrieben, erfolgen. Vorzugsweise erfolgt eine automatische Sortierungsprozedur, wobei markierte und nicht markierte
25 Partikel in unterschiedliche Verzweigungen des Mikrokanals geleitet werden. Die Steuerung der Sortierungsprozedur erfolgt vorzugsweise dadurch, dass nach Erkennen eines markierten Partikels im Detektionselement ein externes oder in die Mikrostruktur integriertes Ventil umgeschaltet wird, sodass das markierte Partikel in die dafür vorgesehene Verzweigung des Mikrokanals
30 geleitet wird und anschließend das Ventil wieder umgeschaltet wird, sodass nicht markierte Partikel in die andere Verzweigung des Mikrokanals geleitet werden.

- 8 -

Das erfindungsgemäße Verfahren ist ein Kaskadenprozess, der eine gegebenenfalls mehrfache Wiederholung der Detektions- und Abtrennschritte umfasst. Während die aus dem Stand der Technik bekannte Prozedur zur Selektion von Einzelmolekülen nur bei extrem hohen Verdünnungen und somit sehr großen Volumina zuverlässig durchführbar ist, wird beim erfindungsgemäßen Verfahren die Konzentration der durch die Detektionsvorrichtung geleiteten Partikel ausreichend hoch eingestellt, sodass das zu untersuchende Gesamtvolumen an Probeflüssigkeit, welches die Gesamtpopulation der Partikel enthält, gering gehalten werden kann.

Vorzugsweise wird für den ersten Selektionszyklus eine Partikelkonzentration von 10^8 bis 10^{14} pro 100 μ l Probenvolumen und besonders bevorzugt 10^{10} bis 10^{12} Partikel pro 100 μ l Probenvolumen eingesetzt. Bei diesen Bedingungen nimmt man zwar in Kauf, dass neben dem markierten Partikel auch eine Anzahl weiterer negativer Partikel, üblicherweise 10^2 bis 10^3 Partikel zunächst als positiv eingestuft werden. Durch nachfolgende Selektionszyklen, die mit jeweils verringerter Konzentration gegenüber einem vorhergehenden Zyklus durchgeführt werden, können jedoch schließlich einzelne Partikel, welche die vorbestimmten Eigenschaften aufweisen, isoliert werden. Die Verringerung der Partikelkonzentration wird vorzugsweise so gewählt, dass in einem weiteren Selektionsschritt ein positiver Partikel eindeutig identifiziert werden kann. Beispielsweise kann die Partikelkonzentration pro Zyklus um mindestens den Faktor 10^4 , vorzugsweise um den Faktor 10^6 bis 10^8 und besonders bevorzugt um ca. den Faktor 10^7 verringert werden. Das Probenvolumen erhöht sich dabei im allgemeinen nicht wesentlich, da durch den ersten Selektionszyklus eine signifikante Verringerung der Partikelzahl erzielt wurde. Gegebenenfalls können nach dem zweiten Selektionszyklus noch ein oder mehrere weitere Zyklen durchgeführt werden.

Weiterhin umfasst das erfindungsgemäße Verfahren vorzugsweise das Identifizieren oder/und Charakterisieren der gefundenen Partikel mit der vorbestimmten Eigenschaft. Dieser Schritt kann beispielsweise eine

- 9 -

Amplifizierung, z.B. im Falle von Zellen und Viren, eine Vermehrung oder im Falle von Nukleinsäuren eine Amplifikationsreaktion wie PCR oder eine Sequenzierung umfassen. Das identifizierte bzw. charakterisierte Partikel bzw. dessen charakteristische Determinante, z.B. ein auf der Oberfläche
5 präsentierte Protein, kann anschließend dem jeweils dafür vorgesehenen Verwendungszweck zugeführt oder als Grundlage zur Herstellung einer weiteren kombinatorischen Bibliothek, z.B. durch Mutagenese, eingesetzt werden.

10 In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird nach dem Markieren der Partikel, aber vor dem Einbringen der Partikel in die Detektionsvorrichtung eine Affinitäts-Vorselektionsprozedur vorgenommen. Hierzu erfolgt nach der Markierung, z.B. einer Behandlung der Partikelpopulation mit einem markierten Bindemolekül, ein weiterer
15 Behandlungsschritt mit unmarkierten Bindemolekülen, sodass bei Partikeln, die das markierte Bindemolekül nur schwach gebunden haben, durch Dissoziation ein Austausch des markierten Bindemoleküls gegen das unmarkierte Bindemolekül stattfinden kann. Diese schwach bindefähigen und somit unerwünschten Partikel werden in diesem Fall bei der
20 Selektionsprozedur von vornherein nicht als positiv erkannt und scheiden daher aus. Durch Einstellung der Bedingungen bei der Behandlung von markierten Partikeln mit unmarkierten Bindemolekülen kann die "Stringenz" der Affinitäts-Vorselektion eingestellt werden. Durch Erhöhung der Zeitdauer der Inkubation, der Temperatur und der Konzentration unmarkierter
25 Bindemoleküle wird eine Erhöhung der Stringenz erreicht.

Falls die vorbestimmte Eigenschaft des Partikels darin besteht, selektiv an eine Zielsubstanz, aber möglichst nicht an eine mit der Zielsubstanz nahe verwandte Substanz zu binden, kann vor oder/und nach der Markierung der
30 Zielsubstanz eine Inkubation mit der nahe verwandten Substanz erfolgen, sodass Partikel mit einer Affinität für die nahe verwandte Substanz bei der Selektionsprozedur von vornherein nicht erfasst werden.

- 10 -

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Vorrichtung zur Selektion eines Partikels mit einer vorbestimmten Eigenschaft aus einer Population umfassend eine Vielzahl von unterschiedlichen Partikeln umfassend:

- (a) einen optisch transparenten Mikrokanal,
- 5 (b) Mittel zum Einbringen von Partikeln in den Mikrokanal,
- (c) Mittel zur Detektion einer Markierung auf einem durch den Mikrokanal geleiteten Partikel,
- (d) Mittel zum Abtrennen eines markierten Partikels von nicht markierten Partikeln,
- 10 welche dadurch gekennzeichnet ist,
- dass die Mittel (c) und (d) derart ausgebildet sind, dass sie eine mindestens einmalige Wiederholung der Detektions-/Abtrennprozedur vorsehen.

Die Vorrichtung enthält vorzugsweise weiterhin automatische
15 Manipulationsvorrichtungen, Heiz- oder Kühleinrichtungen wie Peltier-Elemente, Reservoirs und gegebenenfalls Zufuhrleitungen für Probenflüssigkeit und Reagenzien sowie elektronische Auswertungsgeräte.

Die Vorrichtung ist insbesondere zur Durchführung des erfindungsgemäßen
20 Verfahrens geeignet.

Weiterhin soll die Erfindung durch die nachfolgenden Figuren erläutert werden. Es zeigen:

- 25 **Figur 1** einen Ausschnitt einer Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Durch einen Mikrokanal (2) werden markierte Partikel (4) und nicht markierte Partikel (6) zu einem Detektionselement (8) transportiert. Bei Erkennung eines markierten Partikels (4) durch das Detektionselement (8)
30 werden Ventile (nicht gezeigt) aktiviert, die an der Verzweigungsstelle (10) des Mikrokanals betätigt werden, sodass die markierten Partikel (4) in die Verzweigung (2a) und

- 11 -

unmarkierte Partikel in die Verzweigung (2b) geleitet werden. Die Partikelkonzentration oder/und die Durchflussgeschwindigkeit durch den Mikrokanal werden beim erfindungsgemäßen Verfahren derart groß gewählt, sodass auch ein Eintritt nicht markierter Partikel (6) in die für markierte Partikel vorgesehene Verzweigung (2a) erfolgt. Durch gegebenenfalls mehrfache Wiederholung der Selektions-/Abtrennprozedur werden schließlich nur markierte Partikel erhalten.

Figur 2

das Prinzip der kaskadenartigen Selektions-/Abtrennprozedur. Die durch den Mikrokanal (20) geleiteten Partikel werden - wie in Figur 1 gezeigt - an einer ersten Verzweigung in einen für die markierten Partikel vorgesehenen Arm (24a) und einen für die nicht markierten Partikel vorgesehenen Arm (22a) des Mikrokanals aufgetrennt. Die durch den Kanalarm (24a) geleiteten Partikel werden an einer weiteren Verzweigung erneut in einen für markierte Partikel vorgesehenen Arm (24b) und einen für nicht markierte Partikel vorgesehenen Arm (22b) aufgetrennt. Gegebenenfalls kann noch eine weitere Auftrennung der durch den Mikrokanal (24b) strömenden Partikel in einen Arm (24c) und einen Arm (22c) erfolgen.

Figur 3

eine Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit multiplen Eingängen. Partikel aus unterschiedlichen Subbibliotheken (30a, 30b, 30c, 30d, 30f) können an einem Schaltventil (32) in einen Mikrokanal (34) eingeleitet und dort der in Figur 1 und Figur 2 gezeigten Kaskaden-Selektions-/Abtrennprozedur unterzogen werden.

Figur 4

eine Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit multiplen Ausgängen. Die durch einen Mikrokanal (40)

- 12 -

strömenden Partikel werden an der Verzweigungsstelle (42) in mehrere Arme (44a, 44b, 44c, 44d) aufgetrennt. Die Auftrennung in mehr als zwei Arme kann beispielsweise bei Verwendung mehrerer Markierungsgruppen zweckmäßig sein, um Partikel mit keiner, jeweils einer oder mehreren Markierungsgruppen voneinander zu trennen. Alternativ kann die Trennung auch aufgrund der Intensität der Markierung durch Einstellung entsprechender Cutoff-Werte am Detektor erfolgen.

5

10

Patentansprüche

1. Verfahren zur Selektion eines Partikels mit einer vorbestimmten
5 Eigenschaft aus einer Population umfassend eine Vielzahl von
unterschiedlichen Partikeln, umfassend die Schritte:
 - (a) Bereitstellen einer Population von unterschiedlichen Partikeln,
 - (b) Markieren von Partikeln, die die vorbestimmte Eigenschaft
aufweisen,
 - 10 (c) Leiten der Partikel in einem Mikrokanal durch ein
Detektionselement, das zwischen markierten und nicht
markierten Partikeln unterscheiden kann,
 - (d) Abtrennen markierter Partikel, und
 - (e) mindestens einmaliges Wiederholen der Schritte (c) und (d),
15 wobei die Konzentration der Partikel in einem nachfolgenden
Zyklus gegenüber einem vorhergehenden Zyklus verringert
wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
20 **dadurch gekennzeichnet,**
dass die Partikel aus Zellen, Teilen von Zelloberflächen,
Zellorganellen, Viren, Nukleinsäuren, Proteinen und niedermolekularen
Substanzen ausgewählt werden.
- 25 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Population eine kombinatorische Bibliothek umfasst.
4. Verfahren nach Anspruch 3,
30 **dadurch gekennzeichnet,**
dass die kombinatorische Bibliothek aus genetischen Packungen wie
Phagen, Zellen, Sporen oder Ribosomen ausgewählt wird.

- 14 -

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Population mehr als 10^8 unterschiedliche Partikel umfasst.
- 5 6. Verfahren nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Population mehr als 10^{12} unterschiedliche Partikel umfasst.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
10 dass das Markieren eine Inkubation der Partikel mit einer eine nachweisbare Markierung tragenden Zielsubstanz umfasst.
8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
15 dass als Markierung eine Fluoreszenzmarkierungsgruppe verwendet wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
20 dass die Partikel durch einen Mikrokanal mit einem Durchmesser von 1 bis $100\ \mu\text{m}$ geleitet werden.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9,
dadurch gekennzeichnet,
25 dass die Partikel mittels eines hydrodynamischen Flusses durch den Mikrokanal geleitet werden.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet,
30 dass die Detektion der markierten Partikel durch Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie erfolgt.

- 15 -

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Detektion der markierten Partikel durch eine zeitaufgelöste
Fluoreszenz-Abklingmessung erfolgt.
- 5
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Abtrennen das Leiten der markierten Partikel und der nicht
markierten Partikel in unterschiedliche Verzweigungen des
10 Mikrokanals umfasst.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Konzentration im ersten Selektionszyklus der durch den
15 Mikrokanal geleiteten Partikel im Bereich von 10^8 bis 10^{14} pro 100 μ l
Probenvolumen liegt.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
20 dass die Konzentration der Partikel in einem nachfolgenden
Verfahrenszyklus um mindestens den Faktor 10^4 verringert wird.
16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, weiterhin
umfassend das Identifizieren oder/und Charakterisieren eines Partikels
25 mit der vorbestimmten Eigenschaft.
17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, weiterhin
umfassend einen Affinitäts-Vorselektionsschritt, wobei die markierten
Partikel Bedingungen ausgesetzt werden, bei denen schwächer
30 markierte Partikel ihre Markierung verlieren.

- 16 -

18. Verfahren nach Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
dass nach dem Markieren eine Inkubation mit einer unmarkierten
Zielsubstanz erfolgt.

5

19. Vorrichtung zur Selektion eines Partikels mit einer vorbestimmten
Eigenschaft aus einer Population umfassend eine Vielzahl von
unterschiedlichen Partikeln umfassend:

- (a) einen optisch transparenten Mikrokanal,
10 (b) Mittel zum Einbringen von Partikeln in den Mikrokanal,
(c) Mittel zur Detektion einer Markierung auf einem durch den
Mikrokanal geleiteten Partikel,
(d) Mittel zum Abtrennen eines markierten Partikels von nicht
markierten Partikeln,

15

dadurch gekennzeichnet,
dass die Mittel (c) und (d) derart ausgebildet sind, dass sie eine
mindestenseinmalige Wiederholung der Detektions-/Abtrennprozedur
vorsehen.

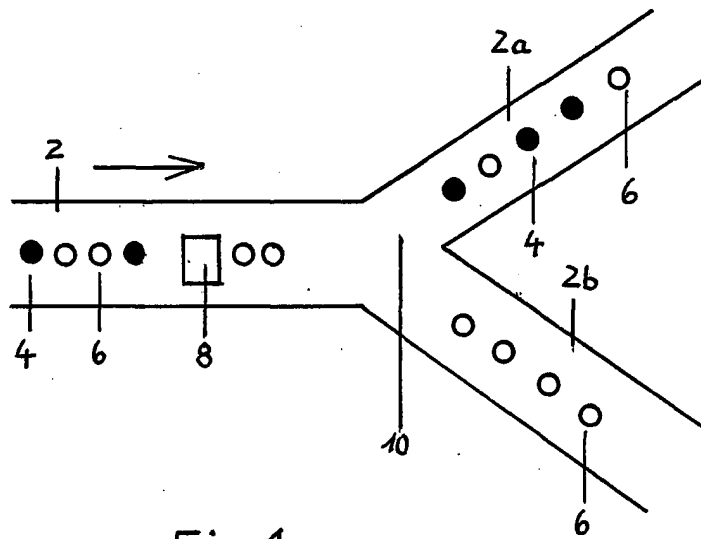


Fig.1

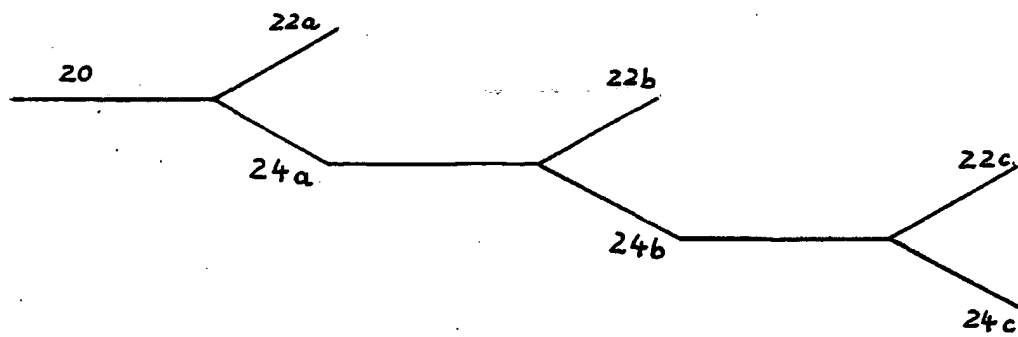


Fig.2

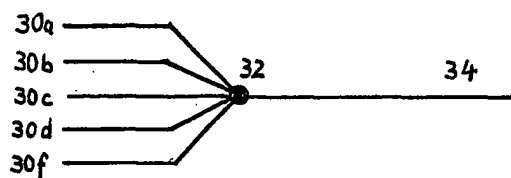


Fig.3

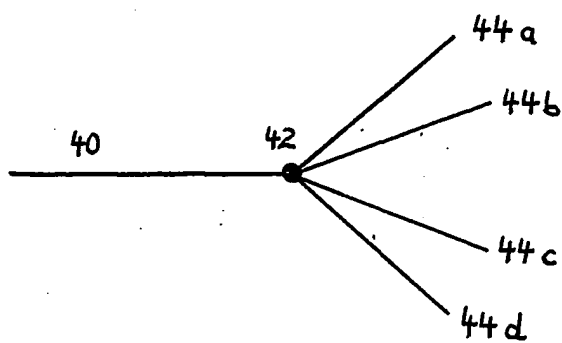


Fig.4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter Application No
PCT/EP 01/07190

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N15/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 66318 A (JACOBSON STEPHEN C ;LOCKHEED MARTIN ENERGY RES COR (US); RAMSEY J) 23 December 1999 (1999-12-23) page 4, paragraph 2 page 7, paragraph 2 -page 8, paragraph 1 page 12, line 11-27 page 26, line 10 -page 27, line 3 figure 5	1-4, 7-10, 12, 13, 16, 19
A	WO 91 15750 A (CARRI MED LTD) 17 October 1991 (1991-10-17) page 2, line 18 -page 3, line 25 page 3, paragraph 3 --- -/-	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 October 2001

Date of mailing of the international search report

10/10/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Zinngrebe, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 01/07190

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 837 200 A (DIESEL EDGAR ET AL) 17 November 1998 (1998-11-17) column 1, line 1-17 column 2, line 37-67 column 3, line 15 column 5, line 56 -column 6, line 11; figure 7	1
X	US 3 827 555 A (KAMENSKY L ET AL) 6 August 1974 (1974-08-06) column 12, line 14-31; figure 4	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/07190

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9966318	A	23-12-1999	US 6120666 A AU 4569699 A EP 1093579 A1 WO 9966318 A1	19-09-2000 05-01-2000 25-04-2001 23-12-1999
WO 9115750	A	17-10-1991	WO 9115750 A1	17-10-1991
US 5837200	A	17-11-1998	DE 19520298 A1 EP 0745682 A1 JP 8332074 A	05-12-1996 04-12-1996 17-12-1996
US 3827555	A	06-08-1974	US 3984307 A	05-10-1976

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter  es Aktenzeichen

PCT/EP 01/07190

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N15/14

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99 66318 A (JACOBSON STEPHEN C ;LOCKHEED MARTIN ENERGY RES COR (US); RAMSEY J) 23. Dezember 1999 (1999-12-23) Seite 4, Absatz 2 Seite 7, Absatz 2 -Seite 8, Absatz 1 Seite 12, Zeile 11-27 Seite 26, Zeile 10 -Seite 27, Zeile 3 Abbildung 5	1-4, 7-10,12, 13,16,19
A	WO 91 15750 A (CARRI MED LTD) 17. Oktober 1991 (1991-10-17) Seite 2, Zeile 18 -Seite 3, Zeile 25 Seite 3, Absatz 3 --- -/-	1

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

A Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

3. Oktober 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

10/10/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Zinngrebe, U

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/07190

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 837 200 A (DIESEL EDGAR ET AL) 17. November 1998 (1998-11-17) Spalte 1, Zeile 1-17 Spalte 2, Zeile 37-67 Spalte 3, Zeile 15 Spalte 5, Zeile 56 -Spalte 6, Zeile 11; Abbildung 7	1
X	US 3 827 555 A (KAMENSKY L ET AL) 6. August 1974 (1974-08-06) Spalte 12, Zeile 14-31; Abbildung 4	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/07190

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9966318	A	23-12-1999	US	6120666 A	19-09-2000
			AU	4569699 A	05-01-2000
			EP	1093579 A1	25-04-2001
			WO	9966318 A1	23-12-1999
WO 9115750	A	17-10-1991	WO	9115750 A1	17-10-1991
US 5837200	A	17-11-1998	DE	19520298 A1	05-12-1996
			EP	0745682 A1	04-12-1996
			JP	8332074 A	17-12-1996
US 3827555	A	06-08-1974	US	3984307 A	05-10-1976